

МЕТОДИКА ДОВГОТРИВАЛОГО КУЛЬТИВУВАННЯ ПЕРВИННО ДИСОЦІЙОВАНИХ КЛІТИН СІТКІВКИ

А. О. Кришталь^{1, а}, Г. В. Думанська², М. С. Веселовський²

¹ Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,
Фізико-технічний інститут

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна)

Анотація

Сітківка — це периферична частина зорового аналізатора. Від неї інтегровані сигнали візуальної інформації передаються волокнами зорового нерва (ЗН) в підкоркові центри головного мозку. Зоровий нерв формують аксони гангліозних клітин – висхідних нейронів сітківки. Авторами запропонована *in vitro* модель — первинна культура дисоційованих клітин сітківки. Завдяки їй стає можливим вивчення особливостей передачі сенсорної інформації з використанням сучасних електрофізіологічних та фармакологічних методів дослідження. В роботі представлено основні етапи підготовки та культивування.

Ключові слова: культура, сітківка, гангліозні клітини сітківки

Вступ

Око – складний орган сенсорного сприйняття, еволюція якого починається з примітивних світлочутливих плям на поверхні тіла безхребетних. Воно складається з шару рецепторів, системи лінз, яка фокусує світло на ці рецептори, і системи нервів, яка проводить імпульси до мозку. Світло, яке потрапляє в око, долає шлях крізь прозорі шари клітин до фоторецепторів сітківки, де й відбувається перетворення оптичної інформації в електричні імпульси, які по зоровому тракту надходять до мозку [2].

Вперше анатомічна будова шарів сітківки була замальована Сантьяго Рамоном-і-Кахалем наприкінці XIX сторіччя. Завдяки його дослідженням стало зрозуміло, що функціонування нервової системи безпосередньо залежить від форми та розташування нейронів, а, окрім цього, від області виникнення та кінцевої мішені нервового імпульсу.

Дослідження механізмів нейротрансмісії від нейронів сітківки до аналітичних ділянок головного мозку відіграє важливу роль у створенні та впровадженні нових методів лікування та профілактики тяжких патологій, пов'язаних з дисфункцією сітківки та зорового нерва (ЗН). В наш час активно ведеться робота з пошуку зв'язку між вивільненням окремих нейромедіаторів і активацією відповідних постсинаптичних рецепторів, що виконують функціональну роль в передачі зорового сигналу [5]. Наприклад, було встановлено, що збуджувальна нейропередача в ЗН опосередковується вивільненням глутамату та активацією постсинаптичних НМДА- та не-НМДА-рецепторів [4, 6]. Однак, проведення якісного експерименту можливо за наявності належної матеріаль-

ної бази. Тому цінність детального розгляду основних етапів створення культури нервових клітин *in vitro* не викликає ніяких сумнівів.

1. Структура та функції сітківки

Сітківка – внутрішня світлочутлива оболонка ока, що простягається спереду майже до війкового тіла. Вона організована в 10 шарів і містить палички та колбочки (зорові рецептори), а також чотири типи нейронів: біполярні, горизонтальні, амакринні та гангліозні клітини [1].

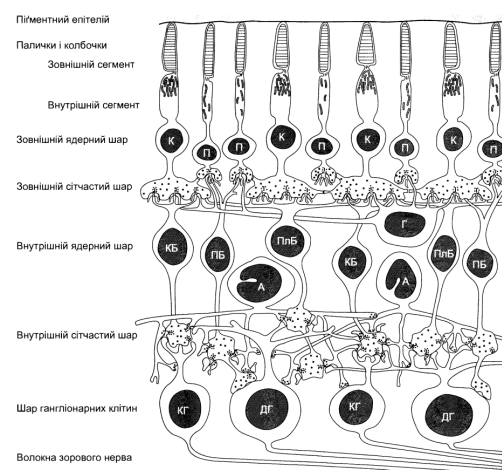


Рис. 1. Нейронні компоненти позаякмової частини сітківки. К – колбочка; П – паличка; КБ, ПБ, ПЛБ – карликові, паличкові та плоскі біполярні клітини; ДГ, КГ – дифузні і карликові гангліозні клітини; Г – горизонтальні клітини; А – амакринні клітини. Рисунок з [1]

^аannakryshthal01@gmail.com

Світло, потрапляючи на фоторецептори, викликає в них локальні градуальні сигнали, які передаються до біполярних клітин, а з них – до гангліозних. Аксо-ни гангліозних клітин проводять інтегровані сигнали до підкоркових центрів нервової системи. Горизонтальні та амакринні клітини слугують посередниками між іншими типами клітин. Перші зв'язують між собою клітини фоторецепторів, які прикріплюються до зовнішнього сітчастого шару, а другі – гангліозні клітини у внутрішньому сітчастому шарі [3].

2. Процедура виділення та ферментативна обробка сітківки

Препарація сітківки повинна була виконуватися за найменший можливий час після декапітації тварини. Це було необхідно через ускладнення процедури відокремлення складових ока внаслідок загибелі клітин сітківки за відсутності обміну важливих для їх функціонування елементів.

Якісне виконання основних стадій процесу залежить як від детальної підготовки та стерильності необхідних інструментів, так і від середовища для виділення та культивування клітин. Під час приготування середовищ був досягнений сталий рівень рН. Для середовища для виділення та культивування рН становив 7,4 і 7,2 відповідно. Контроль рівня рН виконувався за допомогою рН метру фірми "WTW" (рН 526). Стерилізація середовищ забезпечувалася шляхом фільтрації через мембрани з порами діаметром 0,22 мкм.

2.1. Середовище для виділення

В даній роботі використовувалося заздалегідь підготовлене середовище з буфером *HEPES* до якого було додано необхідні реактиви фірми "*Sigma*", США (50 од/мл бензилпеніциліну та 50 мг/мл стрептоміцину сульфату). Точний склад розчину представлений в Табл.1.

Табл. 1. Середовище для виділення *MEM+HEPES*(20 млМ)

H ₂ O	100 мл
<i>MEM (SIGMA, M – 0268)</i>	960 млг
<i>HEPES (H3375 acid)</i>	476 млг
Бензилпеніцилін	50 мкл
Стрептоміцин сульфат	50 мкл

2.2. Середовище для культивування

Середовищем для культивування слугувало мінімальне середовище Ігла з доданими до нього реактивами американських фірм "*Sigma*" (220 млг 1,25% розчину інсуліну, 25 од/мл бензилпеніциліну та 50 мг/мл стрептоміцину сульфату) та "*Gibco*" (10 мл 10% кінської сироватки). Склад вказано в Табл. 2.

Табл. 2. Середовище для культивування

H ₂ O	100 мл
<i>MEM (SIGMA, M – 0268)</i>	960 млг
<i>Gibco</i>	10 мл
<i>NaHCO₃</i>	220 млг
Інсулін (1,25% розчин)	220 млг
Бензилпеніцилін	50 мкл
Стрептоміцин сульфат	50 мкл

2.3. Основні етапи

В експерименті були використані білі безпородні щури одного дня після народження, обох статей.

Всі маніпуляції виконувалися в стерильному боксі з духовою шафою задля запобігання контамінації. В ході даної роботи нами були запропоновані та виконані наступні стадії цього процесу:

- Перший етап (без використання мікроскопа):
 - 1) Декапітація щура
 - 2) Виділення очного яблука
 - 3) Занурення об'єкта в середовище для виділення, яке міститься в завчасно підготовленій чашці Петрі діаметром 35 мм
- Другий етап (безпосередньо під мікроскопом):
 - 1) Фіксація ока на силіконовій підложці, яка знаходиться на дні чашки Петрі діаметром 35 мм, за допомогою маленьких голочок
 - 2) Виконання обережного кругового надрізу під кутом до поверхні ока трохи відступивши від зубчатого краю
 - 3) Видалення рогівки, кришталика та склоподібного тіла
 - 4) Відділення хоріоїдної оболонки від сітківки
 - 5) Відокремлення сітківки від зовнішньої оболонки зорового яблука та перерізання зорового нерва
 - 6) Фрагментація сітківки
- Третій етап:
 - 1) Ферментативна обробка з використанням трипсину (*Trypsin type XI "Sigma"*, США) за температури 37°C протягом 8 хвилин
 - 2) Багаторазове промивання отриманої тканини середовищем для культивування
 - 3) Механічне розділення клітин сітківки методом багаторазового пропускання через Пастерівські піпетки різного діаметру
 - 4) Переміщення отриманої суспензії в завчасно підготовлені чашки Петрі покриті поліорнітином ("*Sigma*", США)
 - 5) Культивування клітин в інкубаторі в умовах атмосфери збагаченої CO₂ (5 ± 0,5%) при 37 ± 0,5°C і вологості 80%

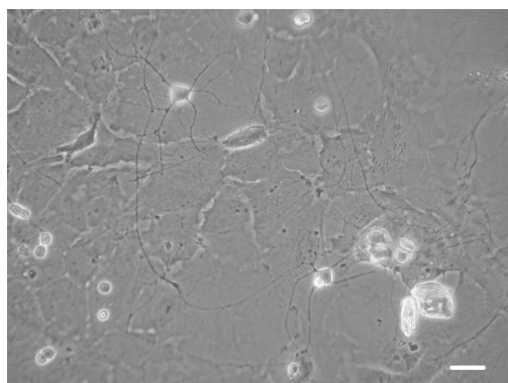
Призупинення проліферації гліальних клітин здійснювалося за допомогою внесення до середовища цитозин-А-Д-арабіно-фуранозиду (*Ara-C*, "*Sigma*", США) концентрацією 10 мкМ на третю добу культивування. На четверту добу відбувалася повна за-

міна середовища для культивування, а далі через кожні 5 дів — часткова.

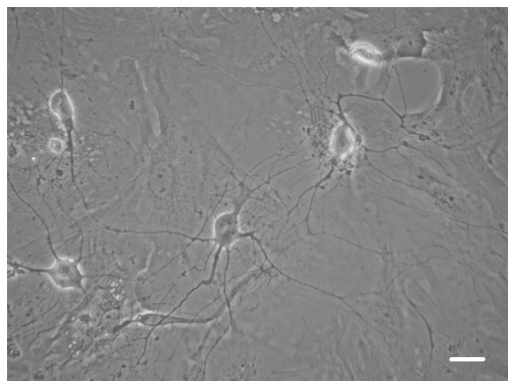
3. Характеристики отриманої культури

В умовах культивування гангліозні клітини сітківки розвивалися за своїми фенотипічними характеристиками та регенерували свої аксони. Мікроскопічне зображення клітин отриманої авторами культури представлено на Рис.2а,2б. Можна побачити, що на фотографіях добре розрізняються гангліозні клітини сітківки. Цей факт є необхідною складовою для використання даної культури у подальших електрофізіологічних дослідженнях.

Також, варто зазначити, що авторам вдалося забезпечити успішне підтримання життєдіяльності первинної культури клітин сітківки протягом 1 місяця і більше.



(а)



(б)

Рис. 2. Отримана культура гангліозних клітин сітківки (а, б). Масштаб складає 20 мкм

Висновки

Основне завдання культивування клітин — підтримання їх життя в створених лабораторних умовах. Внаслідок цього можливе подальше дослідження електрофізіологічних процесів за норми та патології. Це має безпосереднє значення для моделювання різних патологічних факторів — наприклад, гіпоксії, оксидативного стресу та багатьох інших.

Авторами була отримана первинна культура клітин сітківки з добре розвиненими синаптичними зв'язками, яку можна використовувати для подальших електрофізіологічних та фармакологічних досліджень. Варто зазначити, що за допомогою запропонованої методики культивування можна значно подовжити термін життя нейронів до 1 місяця і більше, що дозволить моделювання не тільки короточасних, а й довготривалих процесів.

Перелік використаних джерел

1. Kim E. Barrett, Susan M. Barman, Scott Boitano, Heddwen Brooks Ganong's Review of Medical Physiology — McGraw-Hill Education / Medical, 25 edition (October 28, 2015).
2. John G. Nicholls, A. Robert Martin, David A. Brown, Mathew E. Diamond, David A. Weisblat, Paul A. Fuchs From Neuron to Brain — Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press; 5 edition (November 7, 2011).
3. Грин Н, Стаут У., Тейлор Д. Биология: В 3-х т. — К. : Мир, 1990.
4. Hanna Dumanska, Nickolai Veselovsky Short-term hypoxia induces bidirectional pathological long-term plasticity of neurotransmission in visual retinocollicular pathway // Experimental Eye Research. — February 2019. — Vol. 179 — P. 25–31
5. G. Wang, G. Ratto, S. Bisti, L. Chalupa Functional Development of Intrinsic Properties in Ganglion Cells of the Mammalian Retina // Journal of Neurophysiology. — 1997 — No. 78, Vol. 6 — P. 2895–2903
6. Г. В. Думанська, О. Е. Пурнинь, О. В. Рихальський, М. С. Веселовський Первинна культура дисоційованих клітин сітківки щура в умовах тривалого культивування: властивості гангліозних клітин // Нейрофізіологія / Neurophysiology. — 2011. — № 4. — С. 369–371.